

氏名	おおきかずひろ 大儀和宏
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第608号
学位授与の日付	平成11年5月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) およびその受容体の構造と機能解析

論文調査委員 (主査)
教授 伊藤信行 教授 佐藤公道 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) はラット下垂体前葉培養細胞のアデニル酸シクラーゼの活性化を指標に、ヒツジ視床下部から単離された新しい神経ペプチドである。PACAP はヒツジ視床下部において 38 アミノ酸残基からなる PACAP 38 と、N 末端側 27 アミノ酸残基からなる PACAP 27 の 2 つの形で存在し、N 末端側の 28 アミノ酸残基のアミノ酸配列は vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と 68% の類似性を有している。しかしながら、PACAP 38、PACAP 27 とともにラット下垂体前葉培養細胞のアデニル酸シクラーゼの活性化において VIP の約 1000 倍強い活性を示し、さらに HIVgp 120 によって誘導される神経細胞死の抑制効果が少なくとも VIP の 100 倍強いことから、PACAP は神経細胞やアストロサイトの細胞保護の作用があるのではないかと考えられている。

このような背景のもとで、申請者は PACAP および PACAP 受容体の構造、機能、発現部位を明らかにすることを目的に、以下に研究を行った。

第1編 Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 前駆体 cDNA の構造と発現解析

PACAP はまず前駆体タンパク質としてアミノ酸に翻訳され、その後プロセッシングを受けて成熟体 PACAP になると考えられる。そこで申請者は、PACAP 前駆体タンパク質をコードする cDNA をクローニングし、その構造を明らかにすると共に、ノザンプロット解析を行い PACAP mRNA の発現部位の特定を行った。ヒツジ視床下部 cDNA ライブラリーより得られた、ヒツジ PACAP 前駆体タンパク質をコードする cDNA 断片には 176 アミノ酸残基、ラット脳 cDNA ライブラリーから得られたラット PACAP 前駆体タンパク質をコードする cDNA 断片には 175 アミノ酸残基からなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、成熟体 PACAP 38 の 38 アミノ酸残基については、ヒツジとラットで完全に一致していた。ゲノム DNA を用いたサザンプロット解析の結果から、PACAP をコードする遺伝子はハプロイドセルあたり 1 コピー存在することが判明し、PACAP 38 と PACAP 27 は同一の前駆体タンパク質から切り出されることが明らかとなった。ノザンプロット解析の結果、視床下部で約 2.4 kb の mRNA の発現が最も多く、ついで精巣で約 1.2 kb の mRNA の発現が見られた。また、精巣での mRNA の発現は時期特異的に発現していることから、PACAP は精子形成に関与していることが示唆された。

第2編 Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) TypeI 受容体 cDNA の構造と発現解析とその性状解析

PACAP は細胞表面にある特異的な受容体を介してシグナル伝達を行い、多くの生理作用を調節していると考えられる。種々のペプチドリガンドを用いた結合実験から PACAP には 2 つの受容体サブタイプが存在することがわかっている。TypeI 受容体は PACAP に特異的である一方で、TypeII 受容体は PACAP と VIP に同じ親和性で結合する。申請者は、PACAP 特異的な受容体 (TypeI 受容体) の構造と性状を明らかにするために、ヒト PACAP TypeI 受容体の cDNA をクローニングすると共に、動物細胞の発現系を構築しその性状解析を行った。ヒト下垂体 cDNA ライブラリーから得られたヒト PACAP TypeI 受容体をコードする cDNA 断片には 77 アミノ酸のシグナル配列を含む 525 アミノ酸残基からなる ORF

が存在し、この ORF には 7 つの疎水性領域が存在していた。ノサンプロット解析の結果、約 7 kb の PACAP Type I 受容体 mRNA は全ての中樞神経系の部位で発現しており、末梢では心臓、胃、小腸などで弱い発現が見られた。また、クロモソームマッピングの結果から、ヒト PACAP Type I 受容体遺伝子は 7 番染色体上に存在することが分かった。次に、ヒト PACAP Type I 受容体をコードする cDNA を CHO-K 1 細胞で発現させ、その膜画分を用いてスキッチャードプロット解析を行ったところ、解離定数 41 ± 6.9 pM の単一の結合部位が存在することが判明した。拮抗結合実験からは PACAP 38 が最も強く結合しついで PACAP 27、そして VIP の結合は PACAP 27 より 1000 倍弱いことが分かった。そして PACAP は用量依存的にこの細胞の細胞内 cAMP の蓄積を刺激したが、VIP は 10^{-6} M 加えた時に細胞内 cAMP の蓄積が見られただけであった。さらに、申請者は昆虫細胞 Sf 9 細胞を用いてヒト PACAP Type I 受容体タンパクを大量発現する系（約 150 pmol/mg protein）を構築し、組み換え体ヒト PACAP Type I 受容体の精製を行った。

以上、本研究は PACAP 前駆体タンパク質、PACAP Type I 受容体の構造、発現部位そして PACAP Type I 受容体の性状を明らかにしたものであり、PACAP の多くの生理作用の解明、PACAP Type I 受容体が介するシグナル伝達系の解明に糸口を与えたばかりではなく、ヒト PACAP Type I 受容体に特異的な非ペプチド性遮断薬、作動薬を創成、開発する上で重要な知見、材料を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

PACAP はラット下垂体前葉培養細胞のアデニル酸シクラーゼの活性化を指標にして、ヒツジ視床下部から単離された新しい神経ペプチドである。PACAP は 38 アミノ酸残基からなる PACAP 38 と、27 アミノ酸残基からなる PACAP 27 の二つが存在し、そのアミノ酸配列は VIP と類似している。しかしながら、PACAP 38、PACAP 27 はともに、アデニル酸シクラーゼの活性化において、VIP の 1000 倍以上の活性を示した。さらに、神経細胞死に対する抑制効果も、VIP より 100 倍以上高いことから、PACAP は神経細胞やアストロサイトに対する細胞保護因子としても期待される。

この様な背景のもとで、著者は PACAP および PACAP 受容体の構造、機能、発現部位を明らかにした。

著者は、PACAP 前駆体タンパク質 cDNA をクローニングし、その構造を明らかにするとともに、PACAP mRNA の発現部位を特定した。ラット脳より得られた、PACAP 前駆体 cDNA は 175 アミノ酸残基からなる前駆体タンパク質をコードしていた。また、ゲノム DNA 解析から、PACAP 遺伝子はハプロイドセルあたり 1 コピーのみ存在することが明らかになり、PACAP 27 と PACAP 38 は同一の前駆体タンパク質から生成することが明らかになった。一方、PACAP、前駆体 mRNA は視床下部で最も発現が高いが、精巣でも発現が見られた。精巣での発現は時期特異的に発現していることから、PACAP は精子形成にも関与していることが示唆された。

さらに、著者は PACAP 受容体の構造と性質を明らかにするため、ヒト PACAP 受容体 cDNA をクローニングし、それを動物細胞で発現させた。ヒト PACAP 受容体は 525 アミノ酸残基からなり、7 つの膜貫通領域が存在した。PACAP 受容体 mRNA は中枢神経系で広く発現するとともに、心臓、胃、小腸などにも発現が見られた。PACAP 受容体を動物細胞で発現させ、その性質を調べたところ、PACAP は PACAP 受容体と特異的に結合し、細胞内の cAMP の蓄積を刺激した。さらに、著者は昆虫細胞で PACAP 受容体を大量に産生させ、PACAP 受容体を精製に成功した。

以上、本論文は PACAP 前駆体および PACAP 受容体の構造、発現、性質を明らかにし、PACAP の生理的役割の解明や PACAP のアゴニストやアンタゴニストの開発に重要な手がかりを与えるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 11 年 4 月 5 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。